

令和元年6月6日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02619

研究課題名（和文）生体動態イメージングを基盤とした新しい免疫薬理学の確立

研究課題名（英文）Establishment of in vivo immunopharmacology

研究代表者

石井 優（ISHII, MASARU）

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：10324758

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 33,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、研究代表者が有する生体イメージング技術を駆使して、近年開発の目覚ましい様々な免疫疾患治療薬をin vivoでの薬理作用を検証するシステムを確立することに成功した。これを用いることにより、関節炎での骨破壊、炎症時に血管内白血球遊走・接着、肺線維症、非アルコール性肝障害などに対する薬効を、実際の生きた組織内で解析することができ、新たな方向性の創薬研究につながった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

元来、本邦で強みのある薬理学・免疫学分野の基礎研究に加え、やはり強みのある光学イメージング技術開発を学際的に融合させることで、実際に薬効を目で見るといふ、in vivoイメージング免疫薬理学を構築できたことは、国際的にも独自性が高く、学術的に大きな意義がある。現在、本評価系を用いた薬効評価・創薬研究に関する共同研究の依頼が国内外から殺到しており、その社会的意義も極めて大きい。

研究成果の概要（英文）：By establishing an original intravital multiphoton microscopy, I have studied on 'real' cellular dynamics with immune and inflammatory systems in intact tissues and organs. Especially we first succeeded in visualizing in vivo behaviors of different cell types in bones, such as osteoclasts, which led to significant conceptual advances on dynamic bone/immune systems. Based on the cutting-edge imaging technology in our hand, in this study, we have established the novel system for analyzing in vivo pharmacological actions of different emerging drugs, which should contribute to launching an original style of immunopharmacology from Japan.

研究分野：免疫学，薬理学

キーワード：医療・福祉

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年の抗体製剤などのバイオ医薬品や分子標的薬などの登場により、免疫疾患に対する薬物治療は大きく様変わりし、臨床現場に劇的な変化が訪れていた。現在に至るまでなお多くの治験・臨床研究が進められる一方で、これらの数ある薬物が具体的にどのような薬理作用を發揮しているか、特に生きた組織・細胞レベルでの作用機序についての研究は置き去りにされている傾向にあった。このような中、国際薬理学連合（IUPHAR）にて「免疫薬理（Immunopharmacology）」の領域が新たに立ち上がり、日本でも研究代表者らがこれに連動して活動を開始した。しかしながら、イギリスを中心に立ち上がった IUPHAR での免疫薬理のムーブメントは、基本的には免疫疾患をターゲットとした薬剤のプロファイリングやその適応疾患・関連するシグナル伝達系などのデータベース化が主であり、本邦としてはその流れに参画しつつも、より独自性の高いアプローチを確立することも求められていた。

その一方で、本邦では活発な薬理学・免疫学領域の基盤研究に加え、光学イメージング技術開発には大きな強みがある。特に研究代表者は、本研究開始以前に世界に先駆けて骨髄内の生体イメージング解析を確立し、さらにその他の臓器・組織のイメージング系の開発にも成功していた。本研究は、研究代表者が技術・経験面で世界的にもリードする「生体イメージング」を駆使して薬理作用を *in vivo* で解析する新しい評価系を確立し、本邦発の次世代の免疫薬理学の確立を目指すものである。

2. 研究の目的

免疫疾患への治療学は近年大きく進歩してきた。例えば、関節リウマチに対する抗 TNF（腫瘍壊死因子）モノクローナル抗体（インフリキシマブなど）の治療の大成功以降、数多くの抗体医薬や分子標的薬などのバイオ医薬品が臨床現場にもたらされた。これらの薬剤は一般的に有効性が極めて高いが、しかしながら、多くの細胞・分子が複雑に絡み合う免疫炎症疾患で、何故単一のサイトカインを抑制するだけでここまで奏功する

かは実際のところその作用機序が明らかとなってきた訳ではなかった。これらの薬剤が具体的にどの組織・細胞をターゲットとして、どういった分子作用機序を担うのかななどの“薬理的”解析はほとんどなされていないのが現状であった。一方で近年、免疫疾患を標的としたバイオ医薬品は開発が加速的に進み、すでに多くの薬剤が登場している。治療の選択肢が増えることは確かに好ましいことではあるが、その適切な「使い分け」のためにも、各薬剤の薬理作用を正確に把握し、各々の特徴に応じた適切な選択を行っていくことが肝要と考えられた。

一方で、免疫・炎症では、細胞の動きの制御（時空間的制御）が極めて重要である。本研究者はこれまでに、組織深部を高解像度かつ低侵襲で観察することができる2光子励起顕微鏡を駆使して、体内で動く免疫細胞を生きたままで観察する研究を行ってきた。特に、従来極めて困難であるとされてきた、硬い骨組織内・骨髄腔を、傷つけることなく「非破壊検査」することを世界に先駆けて立ち上げ、炎症において骨を破壊するマクロファージの1種である破骨細胞の動態・機能を可視化することに初めて成功していた。この他にも申請者は皮膚・肺・肝臓・腸管など様々な臓器・組織における「生体2光子励起イメージング系」を立ち上げ、免疫細胞の動態を制御する基本原理を解明してきた。さらに、本システムは新規の薬効評価としても有用である。臨床的効果が示されている薬剤でも、実際にどうやって効いているのか分からないものは結構存在するが、本技術を活用すれば、各薬剤の *in vivo* 作用機序を理解することが可能である。ただ、薬効評価系として確立するためには、再現可能な疾患・治療モデルや、その定量的・数理的解析法、評価モデルなどの開発を行う必要がある。本研究の目的は、生体多光子励起イメージング系を改良し、急速に開発されつつある免疫疾患治療薬の真の薬理作用を解析して次世代創薬に繋げるための「*in vivo* 免疫薬理学」を確立するものである（図1）。

3. 研究の方法

生体イメージングに基づく *in vivo* 免疫薬理研究を確立するの本研究では、(1) 免疫疾患を標的とした各種バイオ製剤・分子標的薬に関する、生体イメージングによる新しい *in vivo* 評価系の構築 と (2) これを駆使して各種薬剤の評価を実際に評価し、「免疫細胞動態を標的とした新しい免疫薬理」の学理の確立 を行った。(1)の技術開発では、具体的には、①骨・関節・皮膚・神経の生体イメージング系を確立し ②それぞれの4Dイメージングデータの自動定量

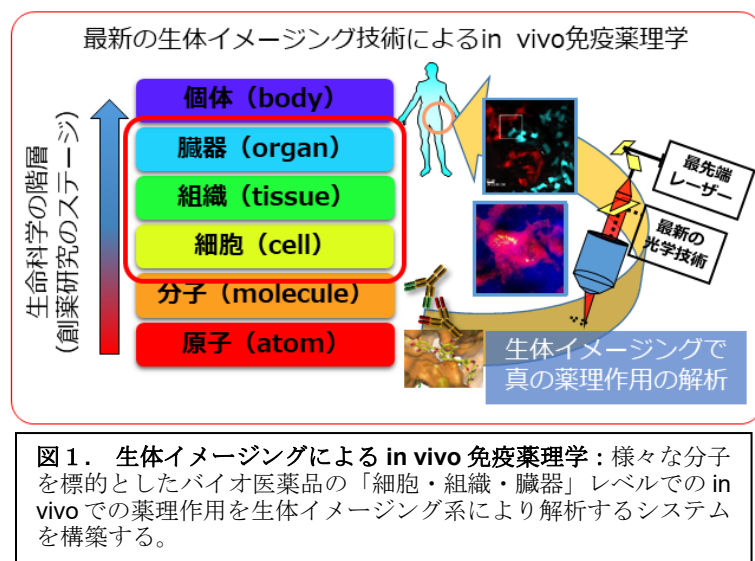


図1. 生体イメージングによる *in vivo* 免疫薬理学：様々な分子を標的としたバイオ医薬品の「細胞・組織・臓器」レベルでの *in vivo* での薬理作用を生体イメージング系により解析するシステムを構築する。

解析系を開発し ③種々の薬剤のプロファイリングを行った。これには、光学イメージング技術の改良・モデル動物実験系の開発・画像の数理解析ソフト開発・各薬剤の薬理効果判定などの技術要素が含まれるが、イメージング・動物実験系については当該研究室にて、ソフトウェア開発に関しては、情報処理の専門家との連携で行った。また(2)の具体的な免疫薬理学研究としては、骨・関節疾患、皮膚炎症、中枢神経炎症のモデル系を利用して、各種薬剤の *in vivo* での mode of action を検証した。

4. 研究成果

(1) 免疫疾患を標的とした各種バイオ製剤・分子標的薬の生体イメージングに基づいた新しい *in vivo* 薬理評価系の構築

生命動態イメージングを技術基盤とした新しい免疫薬理の確立のために、種々の免疫・炎症疾患モデルにおいて、キーとなる組織・細胞を標識し、生体イメージングにより定量的に解析する系を確立した。具体的には、骨髄・皮膚などのイメージング系に加えて、炎症関節のイメージングや、肺・心臓・血管・肝臓など難易度の高い臓器の生体イメージング、中枢神経（脊髄）のイメージング系の確立に成功した。さらに、これらの系を薬理作用の検討ができるような、より実体的で再現可能な解析系とするために、画像取得から定量的解析まで半自動 (semi-automatic) に遂行できるためのシステムを構築した。

(2) 生体イメージングを駆使した各種薬剤の評価・免疫細胞動態を標的とした新しい免疫薬理の確立

上記(1)で開発した技術を駆使して、本研究期間内では具体的な以下の免疫薬理研究を遂行した。

・骨疾患治療薬（骨吸収抑制薬・骨形成促進薬）の *in vivo* 作用機序の解明

生体骨イメージング系により、破骨細胞や骨芽細胞の同時可視化に成功し、これを用いて、骨形成促進薬である PTH 製剤（テリパラチド）の薬理作用を検討した。その結果、本薬剤は骨芽細胞に作用してその増殖を促す他、破骨細胞との直接接触が亢進し、これが結果として破骨細胞の骨吸収を抑制することが分かった（図2）（文献⑬）。また、骨吸収抑制薬として広く使用されているビスフォスフォネート製剤のうち、アレンドロネート、リセドロネート、ミノドロネートについて *in vivo* での薬理作用を検討し、リセドロネートが最も即効性があることを明らかにした（文献⑭）。

・関節リウマチ治療の生物製剤の *in vivo* 薬効評価

近年、様々な生物学的製剤が関節リウマチ治療において臨床応用され、その骨破壊抑制効果が示されているが、*in vivo* における各種薬剤の作用機序の差異については不明な点が多い。本研究では、生体骨イメージング技術を駆使して、生物学的製剤が破骨細胞の動態に及ぼす効果を検討した。炎症性骨破壊に対して、抗 TNF α 抗体 (5 mg/kg)、抗 IL-6 受容体抗体 (10 mg/kg)、T細胞選択的共刺激調節剤 (CTLA4-Ig) (10 mg/kg) を腹腔内投与し、5日後に生体イメージング観察した。その結果、抗 TNF α 抗体投与群および抗 IL-6 受容体抗体投与群では、成熟破骨細胞の骨吸収能が低下していた。一方、CTLA4-Ig 投与群では、成熟破骨細胞の動態に変化を認めなかったが、破骨前駆細胞の運動能が亢進し、血中へ還流していく様子が

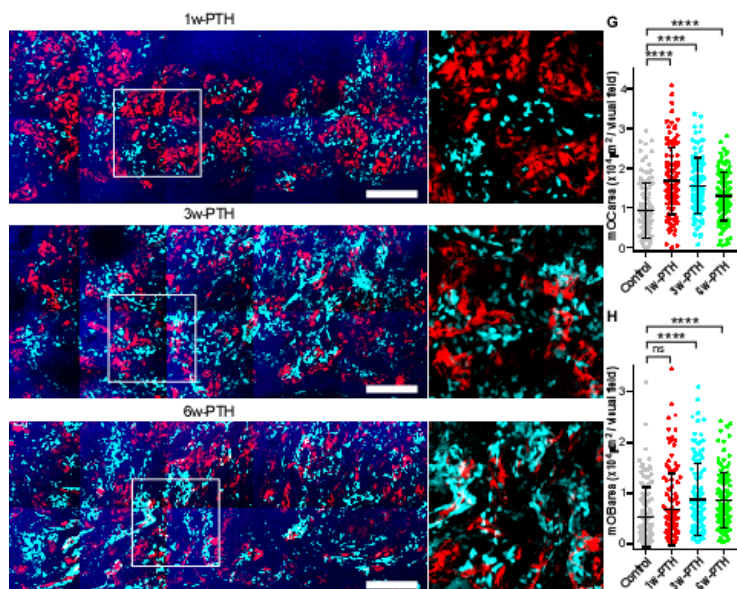


図2. 生体骨イメージングによる PTH 薬理作用の可視化: 破骨細胞 (赤色) と骨芽細胞 (水色) を同時に可視化し、PTH 投与後の経時変化を捉えたもの (左パネル)。細胞の数と分布・細胞間相互作用が変化する (右パネル)。(文献⑬)

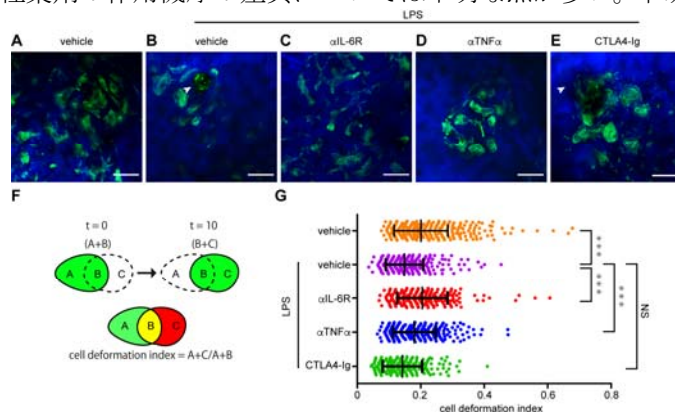


図3. 関節リウマチ治療バイオ製剤の薬理作用の比較: 抗 TNF α 抗体や抗 IL-6R 抗体は成熟破骨細胞の骨吸収を抑制するが、CTLA4-Ig は成熟破骨細胞は抑制しない。(文献⑯)

観察された。さらに、CTLA4-Ig の標的分子 CD80/86 は、成熟破骨細胞よりも破骨前駆細胞に強く発現していることが分かった。抗 TNF α 抗体および抗 IL-6 受容体抗体は主に成熟破骨細胞、CTLA4-Ig は破骨前駆細胞に強く作用し、それぞれ異なる作用機序で骨破壊を抑制している可能性が示唆された (図 3) (文献⑩)。

・生体血管イメージングによる血管作動薬の in vivo 免疫薬理

生体内での血管内イメージング系を用いて、種々の薬剤の薬理作用について実体的な解明を行った。具体的にはトロンボモデュリン製剤が白血球遊走や血管炎症を抑制する作用について動的解明を行った (現在論文投稿中)。

・生体肝臓イメージングを用いた肝疾患治療薬の in vivo 免疫薬理

研究代表者が独自に確立した肝臓イメージング系を用いて、非アルコール性肝傷害 (NASH) これらの研究成果を発表するとともに、国内外での学会活動を通して、in vivo 免疫薬理学の基盤を確立させることに成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 29 件)

- ① Hasegawa T, Kikuta J, Ishii M. (2019) Imaging the bone-immune cell interaction in bone destruction. *Frontiers Immunol.*, in press. (査読有)
- ② Minoshima M, Kikuta J, Omori Y, Seno S, Suehara R, Maeda H, Matsuda H, Ishii M, Kikuchi K. (2019) In vivo multicolor imaging with fluorescent probes revealed the dynamics and function of osteoclast proton pumps. *ACS Central Sci*, in press. (査読有)
- ③ Morita N, Umemoto E, Fujita S, Hayashi A, Kikuta J, Kimura I, Haneda T, Imai T, Inoue A, Mimuro H, Maeda Y, Kayama H, Okumura R, Aoki J, Okada N, Kida T, Ishii M, Nabeshima R, Takeda K. (2019) GPR31-dependent dendrite protrusion of intestinal CX₃CR1+ cells by bacterial metabolites. *Nature* 566(7742): 110-114. (査読有)
- ④ Watanabe Y, Tsuchiya A, Seino S, Kawata Y, Kojima Y, Ikarashi S, Lewis PJS, Lu W-Y, Kikuta J, Kawai H, Yamagiwa S, Forbes SJ, Ishii M, Terai S. (2019) Mesenchymal stem cells and induced bone marrow-derived macrophages synergistically improve liver fibrosis in mice. *Stem Cells Trans. Med.*, 8(3): 271-284. (査読有)
- ⑤ Kikuta J, Ishii M. (2018) Bone imaging: Osteoclast and osteoblast dynamics. *Methods Mol. Biol*, 1763: 137-143. (査読有)
- ⑥ Matsumoto S, Kikuta J, Ishii M. (2018) Intravital imaging of liver cell dynamics. *Methods Mol. Biol*, 1763: 137-143. (査読有)
- ⑦ Matsuura R, Miyagawa S, Kikuta J, Ishii M, Sawa Y. (2018) Intravital imaging of the heart at the cellular level using two-photon microscopy. *Methods Mol. Biol*, 1763: 145-151. (査読有)
- ⑧ Mizuno H, Kikuta J, Ishii M. (2018) In vivo live imaging of bone cells. *Histochem. Cell Biol.*, 149(4): 417-422. (査読有)
- ⑨ Matsuura R, Miyagawa S, Fukushima S, Goto T, Harada A, Shimozaki Y, Yamaki K, Sanami S, Kikuta J, Ishii M, Sawa Y. (2018) Intravital imaging with two-photon microscopy reveals cellular dynamics in the ischemia-reperfused rat heart. *Sci. Rep.*, 8(1): 15991. (査読有)
- ⑩ Das P, Veazey KJ, Van HT, Kaushik S, Lin K, Lu Y, Ishii M, Kikuta J, Ge K, Nussenzweig A, Santos MA. (2018) Histone methylation regulator PTIP is required to maintain normal and leukemic bone marrow niches. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 115(43): E10137-E10146. (査読有)
- ⑪ Tanaka Y, Sabharwal L, Ota M, Nakagawa I, Jiang JJ, Arima Y, Ogura H, Okochi M, Ishii M, Kamimura D, Murakami M. (2018) Presenilin 1 regulates NF- κ B activation via association with breakpoint cluster region and casein kinase II. *J. Immunol.*, 201(8):2256-2263. (査読有)
- ⑫ Baba M, Endoh M, Ma W, Toyama H, Hirayama A, Nishikawa K, Takubo K, Hano H, Hasumi H, Umemoto T, Hashimoto M, Irie N, Esumi C, Kataoka M, Nakagata N, Soga T, Yao M, Kamba T, Minami T, Ishii M, Suda T. (2018) Folliculin regulates osteoclastogenesis through metabolic regulation. *J. Bone Miner. Res.*, 33(10):1785-1798. (査読有)
- ⑬ Inaki M, Hatori R, Kikuta J, Ishii M, Matsuno K, Honda H. (2018) Chiral cell sliding drives left-right asymmetric organ twisting. *eLife*, e32506. (査読有)
- ⑭ Sakaguchi Y, Nishikawa K, Seno S, Matsuda H, Takayanagi H, Ishii M. (2018) Roles of enhancer RNAs in RANKL-induced osteoclast differentiation identified by genome-wide Cap-analysis of gene expression using CRISPR/Cas9. *Sci. Rep.*, 14(1): 7504. (査読有)
- ⑮ Kikuta J, Shirazaki M, Sudo T, Mizuno H, Morimoto A, Suehara R, Minoshima M, Kikuchi K, Ishii M. (2018) Dynamic analyses of the short-term effects of different bisphosphonates using intravital two-photon microscopy. *JBMR Plus*, 2(6): 362-366. (査読有)
- ⑯ Matsuura Y, Kikuta J, Kishi Y, Hasegawa T, Okuzaki D, Hirano T, Minoshima M,

- Kikuchi K, Kumanogoh A, Ishii M. (2018) In vivo visualization of different modes of action of biologic DMARDs inhibiting osteoclastic bone resorption. *Ann. Rheum. Dis.*, 77(8):1219-1225. (査読有)
- ⑰ Ueda Y, Ishiwata T, Shinji S, Arai T, Matsuda Y, Aida J, Sugimoto N, Okazaki T, Kikuta J, Ishii M, Sato M. (2018) In vivo imaging of T cell lymphoma infiltration process at the colon. *Sci. Rep.*, 8(1):3978. (査読有)
- ⑱ Furuya M, Kikuta J, Fujimori S, Seno S, Maeda H, Shirazaki M, Uenaka M, Mizuno H, Iwamoto Y, Morimoto A, Hashimoto K, Ito T, Isogai Y, Kashii M, Kaito T, Ohba S, Chung Ui, Lichtler AC, Kikuchi K, Matsuda H, Yoshikawa H, Ishii M. (2018) Direct cell-cell contact between mature osteoblasts and osteoclasts dynamically controls their functions in vivo. *Nat. Commun.*, 9(1):300. (査読有)
- ⑲ Ishii M. (2017) Immunology provides a great success for treating systemic autoimmune diseases – a perspective on immunopharmacology – IUPHAR Review 23. *Br. J. Pharmacol.*, 174(13):1875-1880. (査読有)
- ⑳ Yamaga K, Murota H, Tamura A, Miyata H, Ohmi M, Kikuta J, Ishii M, Tsukita S, Katayama I. (2017) Claudin-3 loss causes leakage of sweat from the sweat gland to contribute to the pathogenesis of atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, (17)33356-0. (査読有)
- ㉑ Nagatake T, Shiogama Y, Inoue A, Kikuta J, Honda T, Tiwari P, Yanagisawa A, Isobe Y, Matsumoto N, Shimojou M, Morimoto S, Suzuki H, Hirata S, Steneberg P, Edlund H, Aoki J, Arita M, Kiyono H, Yasutomi Y, Ishii M, Kabashima K, Kunisawa J. (2017) 17,18-EpETE-GPR40 axis ameliorates contact hypersensitivity by inhibiting neutrophil mobility in mice and cynomolgus macaques. *J. Allergy Clin. Immunol.*, (17) 32949-4. (査読有)
- ㉒ Shigeta H, Mashita T, Kikuta J, Seno S, Takemura H, Ishii M, Matsuda H. (2017) Bone marrow cavity segmentation using Graph-cuts with wavelet-based texture feature. *J. Bioinform. Comput. Biol.*, 15(5): 1740004. (査読有)
- ㉓ Matsui T, Mizuno H, Sudo T, Kikuta J, Haraguchi N, Ikeda J, Mizushima T, Yamamoto H, Morii E, Mori M, Ishii M. (2017) Non-labeling multiphoton excitation microscopy as a novel diagnostic tool for discriminating normal tissue and colorectal cancer lesions. *Sci. Rep.*, 7: 6959. (査読有)
- ㉔ Kon S, Ishibashi K, Katoh H, Kitamoto S, Kajita M, Ishikawa S, Yamauchi H, Yako Y, Kamasaki T, Matsumoto T, Watanabe H, Egami R, Sasaki A, Nishikawa A, Kameda I, Maruyama T, Sasaki Y, Enoki R, Honma S, Imamura H, Oshima M, Soga T, Miyazaki J, Sato T, Duchon M, Shirai T, Tanaka S, Narumi R, Morita T, Nam J, Onodera Y, Yoshioka S, Kikuta J, Ishii M, Imajo M, Nishida E, Fujioka Y, Ohba Y, Fujita Y. (2017) Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. *Nat. Cell Biol.*, 19: 530-541. (査読有)
- ㉕ Miyachi Y, Tsuchiya K, Komiya C, Shiba K, Shimazu N, Yamaguchi S, Deushi M, Osaka M, Inoue K, Sato Y, Matsumoto S, Kikuta J, Wake K, Yoshida M, Ishii M, Ogawa Y. (2017) Roles of cell-cell adhesion and contact in obesity-induced hepatic myeloid cell accumulation and glucose intolerance. *Cell Rep.*, 18: 2766-2779. (査読有)
- ㉖ Otani K, Naito Y, Sakaguchi Y, Seo Y, Takahashi Y, Kikuta J, Ogawa K, Ishii M. (2016) Cell-cycle-controlled radiation therapy was effective for treating a murine malignant melanoma cell line in vitro and in vivo. *Sci. Rep.*, 6:30689. (査読有)
- ㉗ Lim BC, Matsumoto S, Yamamoto H, Mizuno H, Kikuta J, Ishii M, Kikuchi A. (2016) Prickle1 promotes focal adhesion disassembly in cooperation with CLASP-LL58 complex in migrating cells. *J. Cell Sci.*, 129(16):3115-29. (査読有)
- ㉘ Maeda H, Kowada T, Kikuta J, Furuya M, Shirazaki M, Mizukami S, Ishii M*, Kikuchi K*. (2016) Real-time intravital imaging of pH variation associated with cell osteoclast activity and motility using designed small molecular probe. *Nat Chem Biol.*, 12(8):579-85. (査読有)
- ㉙ Iwamoto Y, Nishikawa K, Imai R, Furuya M, Uenaka M, Ohta Y, Morihana T, Ochi S, Penninger JM, Katayama I, Inohara I, Ishii M. (2016) Intercellular communication between keratinocytes and fibroblasts induces local osteoclast differentiation: a mechanism underlying cholesteatoma-induced bone destruction. *Mol Cell Biol.*, 6(11):1610-20 (査読有)

〔学会発表〕 (計 5 件)

- ① 石井 優, 生命動態イメージング技術による免疫・炎症ダイナミクスの解明：日本発の“免疫薬理学”の創出に向けて，第 12 回江橋節郎賞受賞記念講演，第 92 回日本薬理学会年会，2019 年 3 月 15 日
- ② Masaru Ishii, Intravital imaging dissecting immune cell dynamics and modes of pharmacological actions in vivo, JPS Frontier Session, July 2-6, 2018, WCP2018, Kyoto

③ Masaru Ishii, Lipid mediators controlling dynamics of immune and bone cells, Pharmacology 2017, Symposium, December 11th, 2017, London, UK.

④ Masaru Ishii, Sphingosine 1-phosphate controlling bone remodeling and inflammation, FASEB Science Research Conference, August 23rd, 2017, New Orleans (LA), USA

⑤ Masaru Ishii, In vivo bone imaging: opening a new era in the field of bone and mineral research, Symposium, Joint meeting of the Australian & New Zealand Bone & Mineral Society & the International Federation of Musculoskeletal Research Societies, June 18th, 2017, Brisbane, Australia

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：評価方法、評価装置およびプログラム

発明者：石井優、瀬尾茂人、菊田順一、松田秀雄

権利者：国立大学法人大阪大学

種類：特許

番号：特願 2018-007571

出願年：2018

国内外の別：国内

名称：関節炎治療剤

発明者：石井優、長谷川哲雄、菊田順一

権利者：国立大学法人大阪大学

種類：特許

番号：特願 2018-207209

出願年：2018

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.icb.med.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者 該当なし

(2) 研究協力者 該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。